

***Gyógyszermaradványok és más szerves szennyezők
elemzése szennyvizekben, s a Duna vízében:
trimetilszilil (oxim) éter/észter származékokként, GC-
MS módszerrel***

Doktori értekezés tézisei

***Sebőková Agneša
(Sebők Ágnes)***

Témavezető: Perlne Dr. Molnár Ibolya egyetemi tanár

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Kémiai Intézet, Analitikai Kémiai Tanszék



Kémiai Doktori Iskola
Vezető: Dr. Inzelt György egyetemi tanár

Analitikai, kolloid- és környezetkémia, elektrokémia program
Programvezető: Dr. Záray Gyula egyetemi tanár

Budapest, 2009

1. Bevezetés, célkitűzések

Az utóbbi években számos közlemény és tanulmány hívja fel a figyelmet a környezeti vizeinket, termőföldjeinket elárasztó, az élő szervezetekre káros gyógyszermaradványok, s a 21. század életviteléből származó legkülönbözőbb szennyező anyagokra, e környezeti szennyezők minőségi és mennyiségi ismeretének jelentőségére, eltávolításuk szükségességére. Környezeti szennyezők közé tartoznak, pl. a gyógyszerek (gyulladásgátlók, antibiotikumok, antiepileptikumok) és metabolitjaik, a testápolószerek, a tisztítószerek, a műanyaglágyítók, a növényvédő szerek, ezek mindegyike káros hatással lehet a vizek élővilágára és az emberre egyaránt.

Több európai és tengerentúli országban az elmúlt évtizedekben monitoring program készült a felszíni vizekbe került gyógyszermaradványok felkutatására. Ezen programok a vizsgált vizekben számos hatóanyag jelenlétét igazolták. Kutatócsoportunk a hazai környezeti vizekben (befolyó és elfolyó szennyvízben, Duna-vízben, ivóvizekben) található gyógyszermaradványok minőségi és mennyiségi meghatározására elsőként indított kutatásokat. A Magyarországon eladott gyógyszer mennyiségek alapján ismertek a legnagyobb mennyiségben eladásra került gyógyszerek, ezek elsősorban a nem szteroid alapú gyulladásgátló és fájdalomcsillapító készítmények.

Munkám fő célja volt olyan módszerek bevezetése, amelyek alkalmasak a környezeti vizek szennyezőinek azonosítására és mérésére. Az európai és tengerentúli gyakorlatnak megfelelően szennyvíztisztítók és folyóvíz minták szennyezettségének nyomkövetésére.

Munkám három fő részre tagozódik, úgymint,

- (a) a nem szteroid típusú gyulladásgátló gyógyszermaradványok,
- (b) az epesavak elemzésére, valamint,
- (c) a sok összetevőjű elemző rendszer kidolgozására.

2. Kísérleti rész

2.1 Gáz-kromatográfia-tömegspektrometria

A kromatográfiai méréseket a Varian 4000 GC-MS/MS jelű (Varian, Walnut Creek, CA, USA) készüléken végeztük, amely ioncsapda rendszerű tömegszelektív detektorral, automata mintaadagolóval és szeptummal ellátott programozható injektorral rendelkezik. Az elválasztásokat SGE BPX5 kromatográfiai oszlopon végeztük (30 m × 0,25 mm; filmvastagság: 0,25 µm). A vívógáz hélium volt (1 ml/perc). A transfer line hőfoka 280 °C, az ioncsapda hőfoka 210 °C, a manifold hőfoka 80 °C, az ionizációs feszültség 70 eV volt. Az ioncsapda detektor optimális mérési paramétereit a készülék-szoftver (Varian MS Workstation software, version 6.5.) segítségével ellenőriztük, a tömegtartomány: 50-1000

amu, Fil/Mul késleltetés: 306 sec volt. A tömegspektrométer adatfelvételi sebessége 0,54 sec/scan és 0,67 sec/scan volt.

2.2 A modell oldatok és a reagens oldatok készítése

A modell vegyületek 20-25 mg/100 mL bemérése analitikai pontossággal, feloldása etanolban, desztillált vízben, valamint desztillált víz:etanol = 1:1 (v/v) arányú elegyében történt. A modell vegyületekből közös törzsoldatot készítettünk, az eredetihez képest 50-szeres hígítást. Az így készített oldatok 10-500 µL-ét vákuumleparló készülékhez csatlakoztatható, teflonnal fedett, csavarmenettel ellátott reakciócsövekbe (szükség szerint 2 és 4 mL térfogatúak) mértük, és 30-40 °C hőfokú vízfürdőből, vákuumleparló készüléken szárazra pároltuk.

A szilil-származékká alakításhoz, a HMDS, a BSTFA, az MSTFA, az MTBSTFA és a TFE analitikai tisztaságú vegyszereket, további tisztítás nélkül használtuk. Az oldószer mentesített modell vegyületeket:

- 125 µL piridinben oldottuk, majd 225 µL HMDS és 25 µL TFE adtunk hozzá,
- 150 µL piridinben oldottuk, majd 150 µL BSTFA adtunk hozzá,
- 150 µL piridinben oldottuk, majd 150 µL MSTFA adtunk hozzá,
- 150 µL piridinben oldottuk, majd 150 µL MTBSTFA adtunk hozzá,

60, 70, 80 °C hőfokon 30, 60, 90, 120 percen keresztül szilileztük. Az oldatokat szobahőfokra hűtés után, eltérő hígításokban, 1 µL-eket injektáltunk egymást követően 3-5-ször.

Az oximá alakítás reagens oldatát, a 2,5% hidroxilamin-hidroklorid oldatot, 1,25 g hidroxilamin-hidroklorid 50 mL piridinben való oldásával készítettük. Az oldószer mentesített modell vegyületeket

- 125 µL 2,5% hidroxilamin-hidrokloridot tartalmazó piridinben oldottuk, 70 °C és 100 °C hőfokon 30, 60, 90, 120 percen keresztül oximáltuk,
- majd 225 µL HMDS és 25 µL TFE reagens hozzáadása után 70 °C és 100 °C hőfokon 60, 90, 120 percen keresztül szilileztük.

2.3 A mintaelőkészítés

A vizsgált szennyvíz minták 24 órás mintavételből, a Fővárosi Csatornázási Művek, Észak-Pesti Szennyvíztisztító Telepéről származtak. A befolyó és az elfolyó szennyvizet üvegszűrőpapíron (GF/A, d = 125mm) szűrtük, majd homogenizáltuk. Az 500 mL és 1000 mL térfogatú minták pH értékét 1 M HCl oldattal pH = 2, pH = 4 és pH = 7-re változtattuk, minden mintából 3-3 párhuzamos mérést készítettünk. A szilárd fázisú extrakció alkalmazásánál, a fecskendőtest oszlopok (Oasis HLB, Strata-X) előkészítéséhez

- 5 mL n-hexánt, 5 mL etil-acetátot, 10 mL metanolt és 10 mL desztillált vizet, vagy
- 4 mL aceton:etil-acetát (50:50, v/v) elegyét, 4 mL metanolt és 6 mL desztillált vizet használtunk.

A vízmintákat 12 mintafeltétes vákuumkád használatával, 4 mL/perc, 10 mL/perc és 14 mL/perc átfolyási sebességekkel a töltetekre felvittük, majd a szorbenseket vákuum segítségével szárítottuk. A megkötött vegyületeket:

- c) 5 mL n-hexán, 5 mL etil-acetát és 14 mL metanol, vagy
- d) 15 mL aceton:etil-acetát (50:50, v/v) elegyével oldottuk.

Az a) és b) pont szerinti előkészítés után rendre a c) és d) pont szerinti leoldásokat használtuk.

Az extraktumokat lépcsőzetesen: vegyifülkében, majd az oldott levegő eltávolítása után, 30-40 °C hőfokú vízfürdőből vákuumleparló készüléken szárazra pároltuk. Az oldószer mentesített minták vegyületeit trimetilszilil (oxim) éter/észter származékokként GC-MS módszerrel mértük; a szennyezők mennyiségét a származékok szelektív fragmentum ionjai alapján értékeltük.

A Duna-víz minták a Csepel sziget mellől, a Szentendrei sziget mellől, az ELTE-TTK épülete elől, a Csepeli Vízmű mellől, az épülő új szennyvíztisztító közeléből, valamennyi Budapest térségéből származtak. E minták feldolgozásakor mindenben a szennyvizek előkészítésével azonosan jártunk el, azzal a különbséggel, hogy az 1 és 3 L-nyi mennyiségeket az a) pont szerinti előkészítés után, a c) pont szerint oldottuk le.

3. Eredmények, következtetések

3.1 A nem szteroid típusú gyulladásgátló gyógyszerek tanulmánya

Négy nem szteroid típusú gyulladásgátló és fájdalomcsillapító gyógyszer, az ibuprofen, a naproxen, a ketoprofen és a diklofenak, minőségi és mennyiségi meghatározására trimetilszilil (oxim) éter/észter-származékokként mértük.

i) A négy vegyület szilil-származékká alakítását, különböző szililező reagensekkel (a BSTFA, az MSTFA, a HMDS-TFE, az MTBSTFA), a reakció idő (30, 60, 90, 120 perc) és a hőfok (60, 70, 80 °C) változtatásával optimáltuk.

ii) Tanulmányoztuk két elektronütközéses, a külső és a belső ionizáció technikák különbségeit. Megállapítottuk, hogy a belső ionizáció 15-25-ször nagyobb érzékenységgel a külső ionizációhoz viszonyítva.

iii) A származékká alakítás folyamatát két lépésre bővítettük: 1. az oximmá alakításra és 2. az oxim-származékok trimetilszilil-származékká alakítására, amely a ketoprofen-származék válaszcéljének növekedését eredményezte.

iv) Az optimált körülményeket a négy nem szteroid típusú gyulladásgátló gyógyszermaradvány befolyó és elfolyó szennyvízbeni (12 hónapon keresztül), valamint Duna-vízbeni (8 hónapon keresztül) meghatározására alkalmaztuk.

3.2 Az epesavak minőségi-mennyiségi meghatározása

Hat epesav, a kólsav, a litokólsav, a kenodezoxikólsav, az urzodezoxikólsav, a 7-ketolítokólsav és a dehidrokólsav elemzését optimáltuk, trimetilszilil (oxim) éter/észterekként, GC-MS módszerrel. E vegyületek karboxil-, hidroxil- és keto-csoport(ka)t egyaránt tartalmaznak, a származékká alakításuk legegyszerűbb és egyben leghatékonyabb módszere a két lépésből álló eljárás volt: 1. az oximmá alakítás, 2. a trimetilszilil-származékképzés.

i) Bevezető tanulmányunk során az oximmá alakítást 70 °C 30 perc, a szililezést 100 °C 60 percen folytattuk. Ezt követően a hőfokot és a reakció időt változtattuk mind az oximmá (70 °C, 100 °C, 30, 60, 120 perc), mind a trimetilszilil-származékká (70 °C, 100 °C, 60, 90, 120 perc) alakításnál. Az eredményekből kitűnt, hogy:

- a keto-csoportot is tartalmazó epesavak (7-ketolítokólsav, dehidrokólsav) érdekében az oximmá alakítás elkerülhetetlen.

- Az epesav-származékok válaszcsoportjaiból megállapítottuk, hogy mind az oximmá, mind a trimetilszilil-származékká alakításhoz a 70 °C hőfok alkalmazása megfelelő, a válaszcsoportok közötti eltérés hibáinak figyelembe vételével.

ii) A fragmentum-analitikai tanulmány szerint az epesav-származékok tömegspektrumai nagy m/z értékű, jellemző ionokat tartalmaznak.

iii) Reprodukálhatóság és linearitás, valamint visszanyerési vizsgálatokat végeztünk.

iv) Az epesavakat környezeti vízmintákban azonosítottuk és mértük. A befolyó vízmintákban öt, a Duna-víz mintákban három különböző epesavat határoztunk meg.

3.3 A sok összetevőjű elemző rendszer

A sok összetevőjű elemző rendszer összetevőinek kiválasztása több szempont alapján történt: részben saját kutatási tapasztalatok, részben irodalmi adatok, és részben az Észak-Pesti Szennyvíztisztító Telepről származó befolyó és elfolyó szennyvíz mintákban azonosított összetevők alapján. A 63, várhatóan környezeti szennyező, az alábbi csoportokba sorolható:

- *gyógyszerek és metabolitjaik*
- *tartósítószer*
- *műanyaglágyítók és festékszármazékok*
- *kozmetikumok és piperecikkek összetevői*
- *élelmiszerek*
- *ösztrógenek*
- *koleszterin és epesavak.*

Ezen elemző rendszer vegyületeinek egyidejű azonosítását szelektív fragmentum ionjaik alapján, mennyiségi mérését trimetilszilil (oxim) éter/észterekként, vagy alap állapotú formában, 31 perc alatt, GC-MS módszerrel végeztük.

i) Az oximálás és szililezés területén szerzett korábbi tapasztalatok alapján a keto-csoportot is tartalmazó vegyületek származékképzését egyenként tanulmányoztuk, ezek: a ketoprofen, a fenofibrát, az öszttron. A β -öszttradiol és a koleszterin két lépésbeni származékká alakítását ezidáig nem tanulmányoztuk. Az oxim-származékká alakítás reakció körülményeit (70 °C 30 perc) bővítettük mind a hőfokok (70, 100 °C), mind a reakció idő (30, 60, 90, 120 perc) tekintetében. Az eltérő reakció körülményeknek megfelelően a válaszjelek különböztek. A csak szililezés, valamint, az oximálás és szililezés eredményeinek összehasonlításából kitűnt, hogy:

- a fenofibrát és a ketoprofen esetében az oximmá alakítás a válaszjelek növekedését eredményezte. A ketoprofen-oxim-TMS válaszjele 1,5-ször nagyobb, mint a ketoprofen-TMS válaszjele, valamint a fenofibrát-oxim-TMS válaszjele 1,8-szor nagyobb, mint a származékká nem alakult fenofibráté, amely izopropil-észter.

- Az öszttron és a β -öszttradiol esetében az oximálás megfelelő elválasztást biztosít. Mind a mellett, az öszttron-származék válaszjele harmadára csökken.

- A β -öszttradiol és a koleszterin azonos, jól reprodukálható válaszjeleket adott reakció körülménytől függetlenül.

ii) A fragmentum-analitikai vizsgálatok szerint a 63 vegyület legtöbbje eltérő fragmentációt mutat.

iii) A mérések reprodukálhatóságát és linearitását meghatároztuk. A modell vegyületek válaszjeleit különböző koncentráció tartományban mértük: az összetevők mennyiségeit a szennyvízben várhatókhoz igazítottuk, elővizsgálataink és irodalmi adatok alapján. A legtöbb esetben a különböző mennyiségű összetevőkhöz, hibahatáron belül, $RSD\% = 0,71-10\%$, azonos válaszjel tartozik, vagyis a mért tartományban teljesül a linearitás feltétele. A karbamazepin és a dehidrokólsav értékelése alapjául kalibrációs görbe szolgált.

iv) További hitelesítési feltételként a meghatározási határ (limit of quantification = LOQ) és a készülék meghatározási határa (instrument limit of quantification = ILQ) értékeket használtuk. Valamennyi vegyületnél figyelembe vettük a mennyiségi meghatározásoknál elvárt minimális jel/zaj viszonyt: $j/z \geq 10$. Az LOQ értékek 0,92 ng/L (4-hidroxi-fenilecetsav) és 600 ng/L (dehidrokólsav), az ILQ értékek 2,45 pg/1 μ L (4-hidroxi-fenilecetsav) és 1600 pg/1 μ L (dehidrokólsav) közöttiek voltak, vegyülettől függően.

v) A sok összetevőjű elemző rendszer összetevőinek visszanyerését 2 különböző tölteten (Oasis HLB 200 mg, Strata-X 200 mg), 2 eltérő pH értékű (pH = 2, pH = 4) oldatból modelleztük. A szilárd fázisú extrakciót szigorúan azonos körülmények között, 3-3 párhuzamos mintával végeztük. Az eredményekből kitűnik, hogy:

- a Strata-X oszlopon a visszanyerések hatásfoka pH-tól független (pH = 2 értéken 86%, $RSD\% = 0,84-9,2\%$, valamint pH = 4 értéken 86%, $RSD\% = 1,44-9,4\%$).

- Ugyanezen visszanyerések az Oasis HLB tölteten, különböző pH értéken (pH = 2, pH = 4) 10-12 százalékkal magasabbak voltak.

Összességében elmondhatjuk, hogy az Oasis HLB 200 mg töltet az általunk választott vegyületek extrakciójához előnyösebb mintaelőkészítési eszköz, mint a Strata-X 200 mg töltet.

vi) A 3 különböző pH értékű (pH = 2, pH = 4, pH = 7), 500-500 mL térfogatú elfolyó szennyvíz mintát a modell vegyületek hozzáadása nélkül és a modell vegyületek hozzáadásával 1,67-25,74 µg/L (vegyülettől függően) mennyiségekben dúsítás után mértük. A visszanyerések hatásfoka:

- a pH = 2 értékű oldatból átlagban 92% és a pH = 4 értékű oldatból átlagban 94% volt.

- A pH = 7 alkalmazásakor a visszanyerések átlag értéke 82% volt. A benzoésav, a benzoésav-származékok és a dikarbonsavak pH = 7 értékű oldatból nem extrahálódtak.

vii) Az eltérő mennyiségek visszanyerését 500-500 mL térfogatú elfolyó szennyvíz mintához, három különböző mennyiségben (A: 0,84-12,87 µg/L, B: 1,67-25,74 µg/L, C: 3,34-42,91 µg/L, vegyülettől függően) hozzáadott modell oldattal modelleztük. Az eredményekből kitűnik, hogy a különböző mennyiségek visszanyerési hatásfoka egyező: az A, a B, a C esetekben rendre 96%, 94% és 98% volt.

viii) A sok összetevőjű elemző rendszert hazai szennyvíz (befolyó, elfolyó) és Duna-víz minták szennyezőinek elemzésére hasznosítottuk. A szennyvíz mintákban 51, a Duna-víz mintákban 25 vegyületet azonosítottunk és mértünk.

3.4 A reagens műveleti üres és az SPE műveleti üres mérések kérdése

A környezeti vízminták elemzése során kevés a műveleti üresekre vonatkozó irodalmi tapasztalat.

Részletes tanulmányunk alapján bizonyítottuk a műveleti üres minták (a reagens műveleti üres és az SPE műveleti üres minták) mindenkorai elkészítésének és mennyiségi számbavételének jelentőségét:

i) számadatokkal különböztettük meg a reagens műveleti üresből és az SPE műveleti üresből származó azonos szennyezők mennyiségét.

ii) Hét különböző szilárdfázisú töltet (a DSC-18 500 mg, az ENVI ChromP 200 mg, az Oasis HLB 200 mg, az Oasis HLB 500mg, az Oasis MAX 60 mg, az Oasis MCX 60 mg, a Strata-X 200 mg) összehasonlítása alapján megállapítottuk, hogy a műveleti üres nagyobb része a szilárd fázisú extrakcióból származik,

(iii) a szennyezők minősége és mennyisége, a töltet méretétől és gyártójától független, s

(iv) a szennyezők figyelembe vétele, mennyiségeik valós értéke és reprodukálhatósága szempontjából, elengedhetetlen.

4. Új tudományos eredmények; Összefoglalás

4.1 Négy nem szteroid típusú gyulladásgátló és fájdalomcsillapító gyógyszer, az ibuprofen, a naproxen, a ketoprofen és a diklofenak, minőségi és mennyiségi meghatározására trimetilszilil (oxim) éter/észter-származékokként, elsőként tettünk javaslatot. A négy vegyület szililszármazékká alakítását a különböző

szililező reagens, a reakció idő és a hőfok változtatásával optimaltunk. Tanulmányoztuk a külső és a belső elektronütközéses ionizáció technikák különbségeit: megállapítottuk, hogy a belső ionizáció 15-25-ször nagyobb érzékenységgű a külső ionizációhoz viszonyítva.

4.2 Magyarországon elsőként mértük a négy nem szteroid típusú gyulladásásgátló gyógyszermaradványt befolyó és elfolyó szennyvíz, valamint a Duna-víz mintákban.

4.3 Elsőként optimaltunk hat epesav, a kólsav, a litokólsav, a kenodezoxikólsav, az urzodezoxikólsav a 7-ketolítokólsav és a dehidrokólsav elemzését, trimetilszilil (oxim) éter/észterek-ként, GC-MS módszerrel.

4.4 Elsőként azonosítottuk és mértük az epesavakat környezeti vízmintákban. A befolyó vízmintákban öt, a Duna-víz mintákban három különböző epesavat határoztunk meg.

4.5 A sok összetevőjű elemző rendszert, 63, várhatóan környezeti szennyező egyidejű azonosítására és mérésére, elsőként írtuk le:

- i) trimetilszilil (oxim) éter/észterekként, vagy alap állapotú formában,
- ii) szelektív fragmentum ionjaik alapján, 31 perc alatt, GC-MS módszerrel.
- iii) Megállapítottuk, hogy a keto-csoportot tartalmazó szennyezők szempontjából az oximmá alakítás előnyös.

4.6 A sok összetevőjű elemző rendszert elsőként hasznosítottuk hazai szennyvíz és Duna-víz minták szennyezőinek elemzésére. A szennyvíz mintákban 51, a Duna-víz mintákban 25 vegyületet azonosítottunk és mértünk.

4.7 Részletes tanulmányunk alapján elsőként bizonyítottuk a műveleti üres minták (a reagens és az SPE műveleti üres minták) mindenkor elkészítésének és mennyiségi számbavételének jelentőségét:

- i) számadatokkal különböztettük meg a reagens műveleti üresből és az SPE műveleti üresekből származó azonos szennyezők mennyiségét.
- ii) Hét különböző szilárdfázisú töltet összehasonlítása alapján megállapítottuk, hogy a műveleti üres nagyobb része a szilárd fázisú extrakcióból származik,
- (iii) a szennyezők minősége és mennyisége, a töltet méretétől és gyártójától független, s
- (iv) a szennyezők figyelembe vétele, mennyiségeik valós értéke és reprodukálhatósága szempontjából, elengedhetetlen.

5. A tézisek alapjául szolgáló közlemények, előadás és posztterek

Közlemények:

[1] Á. Sebők, A. Vasánits-Zsigrai, Gy. Palkó, Gy. Záray and I. Molnár-Perl: Identification and quantification of ibuprofen, naproxen, ketoprofen and diclofenac present in waste-waters, as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography mass spectrometry.

Talanta 76 (2008) 642-650

[2] Á. Sebők, K. Sezer, A. Vasanits-Zsigrai, A. Helenkár, Gy. Záray, I. Molnár-Perl: Gas chromatography-mass spectrometry of the trimethylsilyl (oxime) ether/ester derivatives of cholic acids: their presence in the aquatic environment.

J. Chromatogr. A 1211 (2008) 104-112

[3] Á. Sebők, A. Vasanits-Zsigrai, A. Helenkár, Gy. Záray, I. Molnár-Perl: Multiresidue analysis of pollutants as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography mass spectrometry.

J. Chromatogr. A 1216 (2009) 2288-2301

Előadás:

1. Sebők Ágnes: Gyógyszermaradványok és más szennyezők elemzése szennyvizekben: trimetilszilil (oxim) észter/éter származékokként, GC-MS módszerrel.

MKE, Fiatal analitikusok előadóülése, Budapest, 2007. november 20.

Poszterek:

2. Á. Sebők, A. Vasanits-Zsigrai, Gy. Záray and I. Molnár-Perl: Analysis of non-steroidal, anti-inflammatory drugs present in waste waters, as trimethylsilyl derivatives, by GC-MS.

Rámcová smernice o vodách, Český Krumlov, 2006. október 10-12.

3. Sebők Ágnes, Zsigrai-Vasanits Anikó, Helenkár András, Perl-Molnár Ibolya, Záray Gyula: Nem szteroid gyulladásgátlók elemzése szennyvizekben: trimetilszilil származékokként, GC-MS módszerrel.

III. Szennyvízágazati Konferencia, Budapest, 2006. november 30.-december 1.

4. Á. Sebők, A. Vasanits-Zsigrai, Gy. Palkó, Gy. Záray, I. Molnár-Perl: Advances in the Gas Chromatographic Mass Spectrometric Analysis of Pharmaceuticals, Present in the Aquatic Environment.

7. Balaton Symposium, Siófok, 2007.szeptember 5-7. és IV. Szennyvízágazati Konferencia, Budapest, 2007. november 29.-30.

5. Ágnes Sebők, András Helenkár, Anikó Vasanits-Zsigrai, Gyula Záray, Ibolya-Molnár Perl: Advances in the Gas Chromatographic Mass Spectrometric Analysis of Pharmaceuticals, Present in waste water.

XIII. Italian - Hungarian symposium on Spectrochemistry Environmental Contamination and Food Safety, Bologna, 2008. április 20-24.